Hochempfindliche gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Anilin in Körperflüssigkeiten und Abwasser

Corinna Krauss

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534917_0014

Aus dem Institut für Klinische Chemie am Klinikum
Großhadern der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Knedel

Hochempfindliche gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Anilin in Körperflüssigkeiten und Abwasser

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der
gesamten Medizin
an der
Ludwig Maximilians- Universität
München

vorgelegt
von
Corinna Krauss
aus
Stuttgart

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. W. Vogt
Mitberichterstatter : Prof. Dr. med. M. Knedel
Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 29.5.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. M. Knedel) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. W. Vogt in der Zeit von November 1980 bis Dezember 1981 durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. rer. nat. K. Jacob für seine stete Hilfe, seine guten Ratschläge und zahlreiche Diskussionen.

Frau G. Schwertfeger möchte ich herzlich danken für die Durchführung der massenspektrometrischen Bestimmungen.

Schließlich sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft gedankt für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Forschungsvorhabens DFG VO 181/2

INHALTSVERZEICHNIS

1.0	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung der quantitativen Bestimmung von Anilin	1
1.2	Übersicht der bisher bekannten Bestimmungs- ..... methoden von aromatischen Aminen	3
1.3	Übersicht über phosphoreinführende Reagenzien ...	5
1.3.1	Allgemeiner Überblick	5
1.3.2	Dimethylthiophosphinsäurechlorid	6
1.4	Problemstellung	9
2.0	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	10
2.1	Präparative Darstellung von N-Dimethylthiophos- . phinylanilin sowie des penta-Deuteroanilin- derivates	10
2.2	Direkte Derivatisierung von Anilin mit Dimethyl- thiophosphinsäurechlorid im analytischen Maßstab	11
2.3	Massenspektrometrische Eigenschaften von ..... N-Dimethylthiophosphinylanilin und des penta- Deuteroderivates	12
2.4	Gaschromatographische Eigenschaften von ..... N-Dimethylthiophosphinylanilin	14
2.5	Eigenschaften des N-Dimethylthiophosphinylanilins bei der gaschromatographisch-massenspektro- metrischen Detektion	17
2.6	Anwendung des Derivatisierungsverfahrens auf ... die quantitative Bestimmung von Anilin aus Wasser, Serum und Urin	20
2.6.1	Bestimmung der Wiederfindung von Anilin nach .... Einengung aus organischen Lösungsmitteln	20
2.6.2	Bestimmung der Wiederfindung von Anilin nach .... Extraktion aus wässrigen Lösungen, Urin und Serum mit anschließendem Einengen	22
2.6.2.1	Extraktion von Anilin mit Extrelut^{R}	22
2.6.2.2	Extraktion von Anilin mit Sep-Pak-C_{18}-Fertig- ... säulen	23
2.6.2.3	Extraktion von Anilin durch Ausschütteln	25

2.7	Kriterien für die Wahl eines internen Standards	27
2.8	Charakterisierung des angewendeten Bestimmungs-verfahrens	28
2.8.1	Linearität der Methode	31
2.8.2	Präzision der Methode	33
2.8.3	Nachweisgrenze der Gesamtmethode	34
2.8.4	Richtigkeit und Spezifität der Methode	34
2.9	Anwendung des Verfahrens auf verschiedene Abwässer	35
2.10	Wertung des Verfahrens	35
3.0	EXPERIMENTELLER TEIL	37
3.1	Geräte	37
3.1.1	Massenspektrometrie	37
3.1.2	Gaschromatographie	37
3.1.3	Szintillationsmessung	38
3.2	Chemikalien	38
3.3	Derivatisierung von Anilin mit Dimethylthio-phosphinsäurechlorid	39
3.3.1	Präparative Darstellung von N-Dimethylthio-phosphinylanilin und des penta-Deuteroanilin-derivates	39
3.3.2	Analytische Derivatisierung von Anilin und penta-Deuteroanilin-Gemischen mit Dimethylthiophosphin-säurechlorid	39
3.4	Aufbereitungsverfahren der Proben zur Derivati-sierung	40
3.4.1	Einengung von Anilin aus einer organischen Phase	40
3.4.1.1	Einengung durch Einblasen im Stickstoffstrom	40
3.4.1.2	Einengung am Rotationsverdampfer	40
3.4.1.3	Eindampfung im Exsiccatorvakuum	41
3.4.2	Extraktion von Anilin aus wässrigen Lösungen	41
3.4.2.1	Extraktion über eine Extrelut^{R}-Kieselgur-Säule	41
3.4.2.1.1	Extraktion aus Wasser	41
3.4.2.1.2	Extraktion aus Urin und Serum	41

3.4.2.2 Extraktion über Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäulen 42
3.4.2.3 Extraktion im Schütteltrichter 42
3.5 Massenfragmentographische Bestimmung von Anilin . 43
nach Derivatisierung
3.5.1 Aus Wasser 43
3.5.2 Aus Serum und Urin 43
4.0 ZUSAMMENFASSUNG 44
5.0 Literaturverzeichnis 46
6.0 Lebenslauf 54

1.0 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung der quantitativen Bestimmung von Anilin

In den letzten zwei Jahrzehnten hat die Herstellung und der Gebrauch von Produkten der chemischen und pharmazeutischen Industrie in so starkem Maße zugenommen, daß die schädlichen Auswirkungen auf Pflanze, Tier und letztlich auch den Menschen immer mehr ins Bewußtsein der Bevölkerung gerückt sind. Der Gesetzgeber kam der allgemeinen Notwendigkeit nach einem besseren Umweltschutz unter anderem durch Festlegung von Höchstwerten für gefährliche Chemikalien in Lebensmitteln und im Produktionsprozess (MAK-, MIK-,TA-Werte) nach.
Es ist daher Aufgabe der analytischen und auch der Klinischen Chemie, Lebensmittelchemie und Arbeitsmedizin geeignete Nachweisverfahren für Chemikalien in Umwelt und Lebensmitteln sowie deren Gehalte im menschlichen Körper zu entwickeln. Als ein Beitrag zu dieser Aufgabe der Klinischen Chemie soll die vorliegende Arbeit verstanden werden.
Aromatische Amine, so auch Anilin, werden bei der Herstellung von synthetischen Farbstoffen in der Papier-, Leder- und Pelzindustrie sowie von Insektiziden und Pharmaka verwendet. Zudem setzt man sie als Reaktionsbeschleuniger und Oxidationshemmstoffe in der Gummiindustrie ein. Sie können auch als Metabolite beim Abbau von Insektiziden, Herbiziden und Pharmaka entstehen. Bei der Kohleveredlung durch Vergasung oder Verflüssigung werden Anilinderivate freigesetzt (SCHULTZ et al. (51), DUMONT et al. (20)). Diese können nun direkt als Industriemüll oder indirekt durch Zersetzung von Kunststoffen, vor allem Urethanprodukten, oder als reduzierte Nitrobenzolderivate in Wasser, Luft oder Erde gelangen.

Eine starke Adsorption an organische Bodenpartikel, zusammen mit dem langsamen Zerfall, führt zu einer Anhäufung der Aniline im Boden und erhöht ihre Verweilzeit bis auf 10 Jahre (HARGESHEIMER et al. (26)). Nach der Bodenpassage gelangen die Metaboliten aus Produktion und Landwirtschaft in das Grundwasser. Werden aromatische Amine von Pflanzen aufgenommen, kann dies zu verringertem Turgor, Chlorose oder Hemmung des Wachstums führen (KHAMOVA und BOKUREV (39)). Niedere Tiere, wie Protozoen, zeigen vermindertes Populationswachstum (SCHULTZ et al. (52)).

Bei höheren Tieren und beim Menschen können Anilin und Anilinderivate sowohl über die Atemwege, die Haut als auch über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen und dann zu den entsprechenden Nitroso- und Hydroxylaminverbindungen umgesetzt werden. Diese bedingen in den Erythrozyten, je nach ihrer Menge, entweder eine reversible Methämoglobinbildung, die durch die starke Bindung von Sauerstoff einen effektiven Sauerstoffmangel im Organismus bewirkt, oder einen irreversiblen Zerfall des Hämoglobins zu Verdoglobin.

Außerdem können, je nach Schwere der Einwirkung, Schäden am zentralen Nervensystem in Form von Rauschzuständen (Anilinpips), oder gar Koma entstehen. Auf der Haut führen aromatische Amine zu Verfärbungen, Hautreizungen bis zu toxischen Dermatosen mit Blasenbildung (HOLSTEIN (31)). Einige aromatische Amine rufen akute hämorrhagische Zystitiden hervor. In der Blase und in den ableitenden Harnwegen wurden Neubildungen als breitbasig aufsitzende oder gestielte Papillome karzinomatöser Natur beobachtet.

Anilin wandelt sich im Organismus in beständige carzinogene Azometaboliten um (HOLSTEIN (31)).

Da schon Spuren an Anilin bzw. aromatischen Aminen im menschlichen Organismus Schäden hervorrufen können, ist es notwendig zur Überwachung und zum Nachweis dieser

analytische Bestimmungsmethoden zu entwickeln, welche bis hinunter in den ng/ml- und pg/ml- Bereich exakte Ergebnisse liefern.

1.2 Übersicht der bisher bekannten Bestimmungsmethoden von aromatischen Aminen

In der Literatur sind bisher eine Vielzahl von Abtrennungs- und Bestimmungsverfahren für Amine inclusive der aromatischen Amine beschrieben. Sämtliche Methoden, welche die Auftrennung der einzelnen Komponenten eines quantitativ zu analysierenden Gemisches mit Dünnschicht- oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie beschreiben, haben sich für die Spurenanalytik nicht bewährt, da hierfür die Nachweisgrenzen zu hoch lagen.
Erst die Gaschromatographie ermöglicht gleichzeitig Abtrennung und Nachweis von Substanzen im ng- und sub-ng-Bereich.
Bei der direkten gaschromatographischen Analyse der freien Amine, wie sie von einigen Autoren (BABA et al. (3), DI CORCIA und SAMPERI (17), OLUFSEN (48), DI CORCIA et al. (18), CHOUDHARY (13), BECHER (4), DALENE et al. (16), HAUGEN et al. (27)) beschrieben wurde, treten jedoch Schwierigkeiten auf.
Diese bestehen z. B. in der Adsorption von Aminen im gesamten chromatographischen System, die durch die Behandlung der Säulenpackung mit Basen wie Kaliumhydroxid (DI CORCIA und SAMPERI (17), DI CORCIA et al. (18)) oder den Zusatz von Ammoniak zum Trägergas (DALENE et al. (16)) verringert werden kann. Ein weiteres Problem stellt die Abtrennung von interferierenden Substanzen dar, das HAUGEN et al. (27) durch die Vortrennung der Proben mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie lösten,wobei sie aber eine Anhebung der Nachweisgrenze in Kauf nehmen mußten.

Die direkte gaschromatographische Analyse wird zudem durch die nicht ausreichende Sensitivität des hierzu meist verwendeten Stickstoff-Detektors für freie Amine (CHOUDHARY (13), BECHER (4), DALENE et al. (16), LIBEER et al. (43)) begrenzt, der eine direkte Quantifizierung nur bis in den oberen ng/ml-Bereich erlaubt.
Diese Schwierigkeit kann durch die Benutzung von noch empfindlicheren, spezifischen Detektoren umgangen werden. Voraussetzung dafür ist jedoch eine Derivatisierung der Amine mit Reagenzien, welche spezifisch detektierbare Elemente oder funktionelle Gruppen enthalten. Die Derivatisierung bringt in die Spurenanalytik außerdem Vorteile durch Erhöhung oder Verringerung der Flüchtigkeit und die Verbesserung der gaschromatographischen Eigenschaften.
Meist wurden dazu fluorhaltige Verbindungen wie Trifluoracetanhydrid (KAWAI und TAMURA (38), BERTANI et al. (5), COUTTS et al. (15), HARGESHEIMER et al. (26)), Pentafluorbuttersäureanhydrid (ANDERSEN und BRAESTRUP (1), BRADWAY und SHAFIK (9), MEDDLE und SMITH (44)), Pentafluorbenzoesäure (BLAU und CLAXTON (6), BOCK und WASER (7)), Pentafluorbenzaldehyd (HOSHIKA (32)), Trifluormethoxytetrafluorpropionsäure (KULIKOVA et al. (41)), 2,6-Dinitro-4-trifluormethylbenzolsulfonsäure (DOSHI und EDWARDS (19)) verwendet.
Die Detektion erfolgte mit einem Elektroneneinfang-Detektor (ECD). Jod- (KUßMAUL und HEGAZI (42)) oder schwefelhaltige Derivatisierungsreagenzien (HOSHIKA (33), HAMANO et al. (24)) erbrachten ähnlich niedrige Nachweisgrenzen.
Einige Autoren kombinierten die gaschromatographische Trennung von derivatisierten Aminen mit der massenspektrometrischen Detektion (FLOHBERG et al. (23), CHAYTOR et al. (12), SMITH und HANRAHAN (53)). Für eine empfindliche Detektion müssen die Derivate im Massenspektrometer stabile Molekülionen oder intensive Fragmente bilden.

NORWITZ und KELIHER (46,47) dagegen koppelten in einer Diazoreaktion die aromatischen Amine mit Verbindungen, welche ein ausgedehntes π-Elektronensystem besitzen. Sie machten sich bei der spektrophotometrischen Detektion die starke Färbung der erhaltenen Derivate zunutze, wobei sie aber nur eine Nachweisgrenze von 500 ng/ml erreichten.
Nur wenige der angeführten Methoden konnten in die Praxis umgesetzt werden. Luftproben mit ihren Verunreinigungen wurden von BECHER (4) und von MEDDLE und SMITH (44) analysiert. Alle Untersuchungen, aus biologischem Material, z.B. Urin oder Serum, Anilin bzw. allgemein aromatische Amine quantitativ in Spuren zu bestimmen, erfaßten nur Mengen bis in den ng/ml-Bereich (ANDERSEN und BRAESTRUP (1), DOSHI und EDWARDS (19), CHOUDHARY (13), HARGESHEIMER et al. (26), BOCK und WASER (7), FLOHBERG et al. (23), BLAU und CLAXTON (6)).

1.3 Übersicht über phosphoreinführende Reagenzien

1.3.1 Allgemeiner Überblick

Unter den phosphorenthaltenden Derivatisierungsreagenzien sind bisher Phosphorsäure- (ERTINGSHAUSEN et al. (21), HEENAN und McCALLUM (29), KNAUS et al. (40), PARSONS (49)), Thiophosphorsäure- (BOWMAN und BEROZA (8), COHEN et al. (14)), Phosphorigsäure- (VILCEANU und SCHULZ (54)), Phosphinsäure- (JACOB et al. (35,37)) und Thiophosphinsäureverbindungen (VOGT (55), JACOB (34)) beschrieben.
Sie lassen sich auf Alkohole, Phenole, Hydroxycarbonsäuren und teils auf Hydroxysteroide bzw. Amine und Aminosäuren anwenden. Die Nachweisgrenze der Derivate mit dem Alkaliflammenionisationsdetektor reicht bis in den Femtogrammbereich. Von den genannten Reagenzien konnten bisher nur das Thiophosphorsäuredimethylesterchlorid (BOWMAN und BEROZA (8)) und das Dimethylthiophosphinsäurechlorid (VOGT (55), JACOB (34)) auf biologische Materialien angewendet werden.

Bei ersterem traten bei der Analytik von phenolischen Insektizid-Spaltprodukten aus Milch und Getreide Abtrennungsprobleme der Nebenprodukte oder des überschüssigen Reagenzes auf (COHEN et al. (14)).
Diese und andere Schwierigkeiten, wie geringe Ausbeute bei der Derivatisierung, hydrolyseempfindliche oder nur kurzzeitig stabile Derivate und schwierige Zugänglichkeit des Reagenzes, liessen nur schwer Erfolge für die Analyse von Ultraspuren aromatischer Amine aus biologischem Material erwarten. Nur mit dem Reagenz Dimethylthiophosphinsäurechlorid konnten bei den bisherigen Untersuchungen an Hydroxysteroiden aus Körperflüssigkeiten die meisten dieser analytischen Probleme zufriedenstellend gelöst werden. Im Folgenden soll das Derivatisierungsreagenz Dimethylthiophosphinsäurechlorid näher beschrieben werden, da dessen Derivate eine Ultraspurenanalyse bis in den pg/ml-Bereich erlauben, wie dies für Hydroxysteroide aus menschlichem Plasma (VOGT et al. (56)) bereits gezeigt werden konnte.

1.3.2 Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Das Reagenz Dimethylthiophosphinsäurechlorid zeichnet sich durch seine kommerzielle Verfügbarkeit und lange Lagerbeständigkeit aus. Bei den Versuchen mit Hydroxysteroiden zeigte sich auch eine hohe Reaktivität mit einheitlichen Umsetzungsprodukten. Die Steroidderivate besitzen eine hohe thermische und hydrolytische Beständigkeit. Sie lassen sich gut gaschromatographisch abtrennen und können sehr empfindlich mit dem Phosphordetektor nachgewiesen werden.

Ebenso werden bei der massenspektrometrischen Detektion stabile Molekülionen erhalten. Diese Methode läßt sich daher für quantitative Bestimmungen im Ultraspurenbereich heranziehen.
Das Reagenz kann auf eine Reihe von Verbindungsklassen (JACOB (34)) angewendet werden (Tab. 1).
Bisher ließ sich die Derivatisierung mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid im Mikrogrammbereich auf zahlreiche Amine übertragen (Tab. 2).

Tab. 1 : Umgesetzte Verbindungsklassen

Primäre Alkohole
Sekundäre Alkohole
Cycloalkohole
Aliphatische Hydroxycarbonsäuremethylester
Phenole
Aromatische Hydroxycarbonsäuremethylester
Aliphatische Amine
Aromatische Amine
Heterocyclische Amine
Aminosäuremethylester
Mercaptane
Thiophenole

Tab. 2 : Umgesetzte Amine

Aliphatische Amine :

- Methylamin
- Ethylamin
- Propylamin-(2)
- Allylamin
- Butylamin-(2)
- Benzylamin
- Cyclohexylamin
- Ethylendiamin
- Putrescin
- Pyrrolidin

Aromatische Amine :

- Anilin
- N-Methylanilin
- o-Toluidin
- p-Toluidin
- 3,5-Dimethylanilin
- 2,4-Dimethylanilin
- 2,6-Dimethylanilin
- 2,6-Diethylanilin
- o-Anisidin
- p-Anisidin
- o-Fluoranilin
- p-Fluoranilin
- p-Bromanilin
- 3,4-Dichloranilin
- 3,5-Dichloranilin
- o-Aminophenol
- p-Aminophenol
- o-Chlor-p-anisidin
- m-Trifluormethylanilin
- p-Trifluormethylanilin
- 4-Amino-4'-chlor-diphenylether
- o-Phenylendiamin

p-Phenylendiamin
α-Naphthylamin
p-Aminobenzoesäuremethylester

Heterocyclische Amine :
2-Aminopyridin
3-Aminopyridin
2-Aminobenzothiazol
2-Amino-5-tert.butyl-thiadiazol

1.4 Problemstellung

Um geeignete Bedingungen zur Quantifizierung von Anilin zu entwickeln, ist es als erstes notwendig, die hohe Flüchtigkeit von Anilin bei der Probenaufbereitung herabzusetzen. Des weiteren stellt sich bei der Analyse von biologischem Material das Problem der Überführung von Anilin aus wässrigen in organische Lösungen, da Dimethylthiophosphinsäurechlorid hydrolyseempfindlich ist und somit eine direkte Derivatisierung in Wasser ausgeschlossen wird. Zudem ist die Methode dann in Bezug auf Reproduzierbarkeit, Richtigkeit und Linearität zu untersuchen. Das Verfahren soll sich besonders für Abwässer, Urin und Serum eignen und dabei möglichst niedrige Nachweisgrenzen (bis in den pg/ml-Bereich) aufweisen.

2.0 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.1 Präparative Darstellung von N-Dimethylthiophosphinylanilin sowie des penta-Deuteroanilinderivates

Als Vergleichssubstanz für die Umsatzbestimmung der nachgewiesenen Ultraspuren von Anilin diente das präparativ dargestllte N-Dimethylthiophosphinylanilin und das penta-Deuteroderivat. Die präparative Umsetzung der freien Amine mit dem Derivatisierungsreagenz Dimethylthiophosphinsäurechlorid in Gegenwart der tertiären Base Triethylamin verläuft glatt und man erhält die beiden Substanzen in jeweils ca. 70% Ausbeute. Die Nebenprodukte, wie das unter anderem durch Spuren von Wasser entstandene Dimethylthio - phosphinsäureanhydrid, können gut durch die Umkristallisation aus Benzol/Petrolether entfernt werden.
Die Reaktion läßt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$(CH_3)_2P(S)Cl + \begin{matrix} C_6H_5NH_2 \\ C_6D_5NH_2 \end{matrix} \xrightarrow{(C_2H_5)_3N} \begin{matrix} (CH_3)_2P(S)NHC_6H_5 \\ (CH_3)_2P(S)NHC_6D_5 \end{matrix} + HCl$$

Die tertiäre Base Triethylamin übernimmt bei der Reaktion folgende wichtige Funktionen:

1. Sie entzieht dem Amin ein Proton, was in der Form der üblichen Basenkatalyse erfolgt und bildet damit ein Anion, welches als besseres Nucleophil eine raschere und energetisch günstigere Reaktion mit dem elektrophilen Phosphinylierungsreagenz eingehen kann.
2. Die tertiäre Base bildet mit dem Dimethylthiophosphinsäurechlorid eine salzartige Zwischenstufe, welche wegen ihrer Ladung den Thiophosphinylrest besser auf das nucleophile Anilinanion übertragen kann.
3. Außerdem neutralisiert ein Überschuß an Base die bei der Reaktion freiwerdende Salzsäure. Dadurch wird das Gleichgewicht der Reaktionsgleichung zugunsten der Reaktionsprodukte nach rechts verschoben.

2.2 Direkte Derivatisierung von Anilin mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid im analytischen Maßstab

Die Derivatisierungsreaktion im analytischen Maßstab wurde mit Mengen zwischen 5 ng und 500 ng Anilin durchgeführt. Die Reaktion ergab bei 0°C und einem hohen Überschuß von Reagenz zu Substrat (100 : 1 bis 1000 : 1) nach einer 30 minütigen Reaktionszeit die höchsten Ausbeuten (Abb.1).

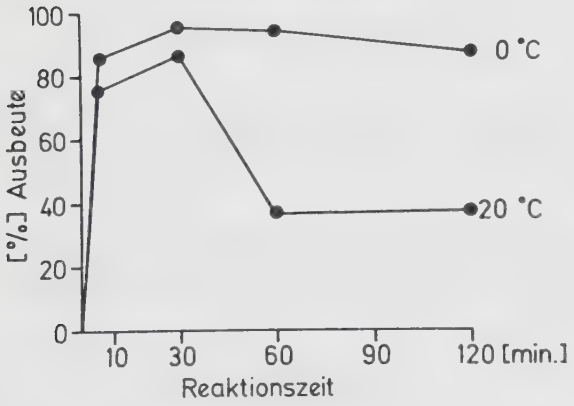

Abb.1 : Reaktionskinetik von Anilin mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid bei 0°C und 20°C.

Das überschüssige Derivatisierungsreagenz läßt sich durch Reaktion mit wenig Natriumbicarbonat in Methanol bei Raumtemperatur im Verlauf von 30 Minuten entfernen. Dabei wandelt sich das Dimethylthiophosphinsäurechlorid in das Natriumsalz der Dimethylthiophosphinsäure um, welche sich nicht störend auf die gaschromatographische Trennung und anschließende massenfragmentographische Bestimmung der Reaktionslösungen auswirkt :

$(CH_3)_2P(S)Cl + 2\ NaHCO_3 \longrightarrow (CH_3)_2P(S)ONa + NaCl + 2CO_2 + H_2O$

Wichtig bei der Durchführung der Derivatisierungsreaktion im Mikromaßstab ist der weitgehende Ausschluß von Wasser durch sorgfältiges Vortrocknen aller Lösungsmittel und ein Arbeiten unter Stickstoffatmosphäre. Geringste Spuren von Wasser reagieren zusammen mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid und der tertiären Base Triethylamin zu Dimethylthiophosphinsäureanhydrid nach folgender Reaktionsgleichung (SASSE, (50)) :

$2\ (CH_3)_2P(S)Cl + H_2O \longrightarrow ((CH_3)_2P(S))_2O + 2\ HCl$

Durch die Behandlung mit Natriumbicarbonat kann auch dieses Nebenprodukt zufriedenstellend aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden.

2.3 Massenspektrometrische Eigenschaften von N-Dimethylthiophosphinylanilin und des penta-Deuteroanilinderivates

N-Dimethylthiophosphinylanilin und N-Dimethylthiophosphinyl-penta-Deuteroanilin weisen im Massenspektrum intensive Molekülionen auf. Als Hauptfragmentierungsreaktion wird in beiden Spektren (Abb. 2 und Abb. 3) die $(CH_3)P(S)(CH_2)$-Gruppe abgespalten. Das entstehende Anilinradikalkation bildet zusammen mit dem Dimethylthiophosphinylkation ein Dublett mit der Masse 93, während beim penta-Deuteroanilinderivat das penta-Deuteroanilinradikalkation bei m/z 98 auftritt. Das vollständige Fragmentierungsschema des N-Dimethylthiophosphinylanilins wurde durch Hochauflösungsmassenspektrometrie und durch Bestimmung der metastabilen Zerfälle erhalten (JACOB et al. (36)). In Abb. 4 ist das Zerfallsmuster des Anilinderivates dargestellt.

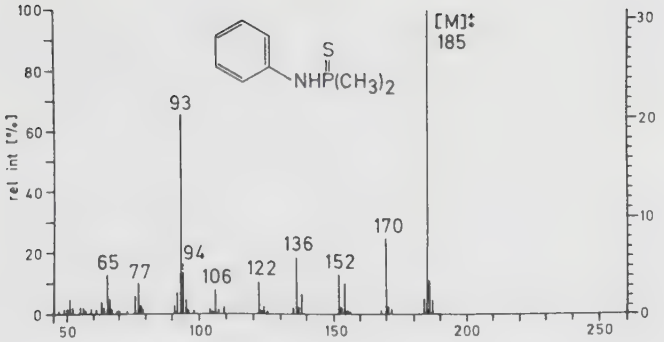

Abb. 2 : EI-Massenspektrum von N-Dimethylthiophosphinyl-anilin

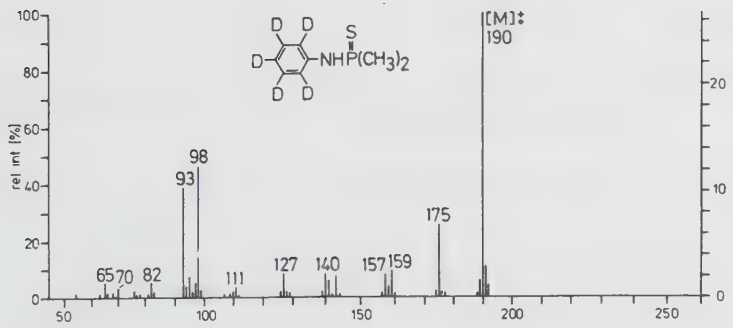

Abb. 3 : EI-Massenspektrum von N-Dimethylthiophosphinyl-penta-Deuteroanilin

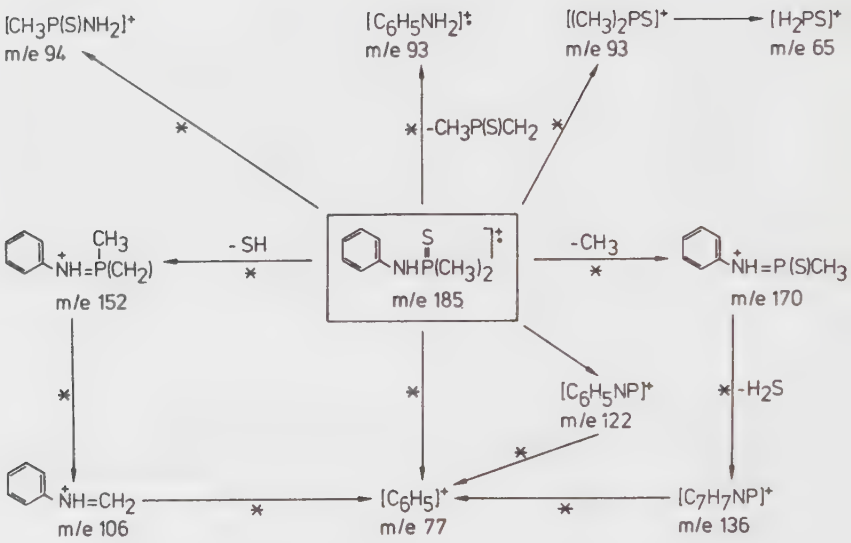

Abb. 4 : Fragmentierung von N-Dimethylthiophosphinylanilin

2.4 Gaschromatographische Eigenschaften von N-Dimethylthiophosphinylanilin

Durch die Derivatisierung mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid werden die gaschromatographischen Eigenschaften des leicht flüchtigen Anilins wesentlich verbessert. In erster Linie wird dabei die irreversible Adsorption an aktive Stellen des chromatographischen Systems entscheidend eingeschränkt. Außerdem wird die Flüchtigkeit im Vergleich zur Ausgangssubstanz verringert, wodurch die Verdampfungsverluste verkleinert werden und zum anderen durch die Verlängerung der Retentionszeiten der Derivate zu einer besseren Abtrennung vom Lösungsmittel führt.

Die hohe hydrolytische und thermische Beständigkeit des N-Dimethylthiophosphinylderivates erlaubt die zersetzungsfreie Probenaufgabe auch bei hohen Injektortemperaturen. Die Proben wurden mit einem Splitverhältnis von ca. 1 : 10 aufgegeben, wobei sich destilliertes Methanol als Lösungsmittel sehr gut bewährte.

Eine hohe Trennleistung für komplexe Gemische von N-Dimethylthiophosphinylamiden und anderen mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid derivatisierbaren Substanzen, wie sie zur quantitativen Bestimmung des Anilingehaltes aus biologischen Quellen (Wasser, Urin und Serum) erforderlich ist, kann mit einer 25 m SE 30-Glaskapillarsäule erreicht werden. Anhand einiger aliphatischer, aromatischer und heterocyclischer Aminderivate wird die gute gaschromatographische Trennbarkeit in Abb. 5 veranschaulicht.

Die unpolare Dimethylsiliconphase SE 30 ist außerordentlich temperaturbeständig (bis 350°C) und zeigt aufgrund dieser und der chemischen Stabilität, sowie der guten Haftung der stationären Phase auf der Glaswand nur geringes Säulenbluten. Die Glaskapillarsäule ergibt bei einer Länge von 25 m gute Trennungen mit schmalen Peaks bei vertretbaren Analysenzeiten.

Durch ein geeignetes Temperaturprogramm konnte Dimethylthiophosphinsäureanhydrid abgetrennt werden, falls dieses nicht schon durch die Behandlung mit methanolischer Natriumbicarbonatlösung zerstört wurde. Das gewählte Temperaturprogramm lag zwischen 90°C bis 230°C mit einer Aufheizrate von 6°C pro Minute.

Für die Detektion im Nanogrammbereich ist ein Flammenionisationsdetektor ausreichend, während bei geringeren Mengen die Kopplung des Gaschromatographen mit dem Massenspektrometer erforderlich ist.

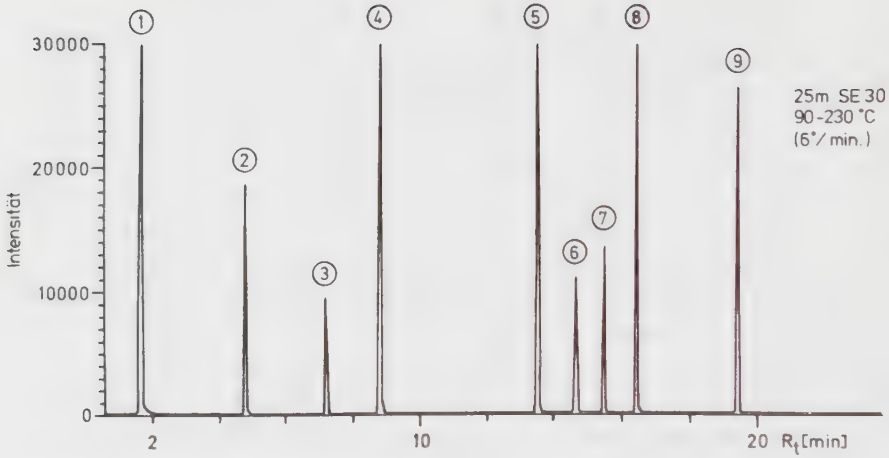

Abb. 5 : Gaschromatographische Trennung eines Gemisches von Dimethylthiophosphinsäurederivaten primärer aliphatischer und aromatischer Amine mit massenfragmentographischer Detektion.

GC-Bedingungen : 25 m SE-30 Glaskapillarsäule, 90-230°C, 6°C/Min., He 3 ml/Min., Splitverhältnis 1 : 10, Injektor 230°C.

MS-Bedingungen : Interface 270°C, Quelle 200°C , 70 eV, R = 1000, Emission 1 mA, detektierte Masse m/z 93.

1 = Dimethylthiophosphinsäuremethylester
2 = Ethylamin-Derivat
3 = sek. Butylamin-Derivat
4 = n-Butylamin-Derivat
5 = Cyclohexylamin-Derivat
6 = Anilin-Derivat
7 = o-Toluidin-Derivat
8 = Benzylamin-Derivat
9 = p-Anisidin-Derivat

2.5 Eigenschaften des N-Dimethylthiophosphinylanilins bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Detektion

Voraussetzung für eine hochempfindliche Detektion von Ultraspuren von Anilin bzw. des Derivates aus einer komplexen Matrix biologischen Ursprungs ist immer zuerst die gute Abtrennung, welche im vorliegenden Falle,wie in Kap. 2.4 beschrieben,mittels Gaschromatographie recht gute Ergebnisse lieferte. Bei der Detektion mit dem FID wird der Response durch den im Derivat enthaltenen Phosphor im Vergleich zu phosphorfreien Verbindungen um ca. ein Drittel bezogen auf die Stoffmenge verringert. Die Anwendung eines Phosphordetektors zur Quantifizierung von Mengen im Picogrammbereich bedarf meist eines aufwendigen Vorreinigungsschrittes zur Entfernung des überschüssigen Derivatisierungsreagenzes. Diese Probleme können durch die massenspektrometrische Detektion umgangen werden, da diese Technik einen hochspezifischen und hochempfindlichen Nachweis gestattet. Voraussetzung für eine hohe Empfindlichkeit bei dieser Detektionsart ist jedoch die Bildung intensiver Molekülionen (s. Kap. 2.3). Durch die gemeinsame Anwesenheit von Phosphor und Schwefel im N-Dimethylthiophosphinylanilin sowie die hohe thermische Stabilität wird ein äußerst intensives Molekülion gebildet.
Die hohe massenspektrometrische Nachweisempfindlichkeit wird durch die Detektion des Anilinderivates im unteren Picogrammbereich veranschaulicht (s. Abb. 6).
Die limitierende Größe ist hierbei nicht die massenspektrometrische Empfindlichkeit,sondern die Gaschromatographie, da sehr geringe Mengen (unter 1pg) wahrscheinlich durch Adsorption im System festgehalten werden.

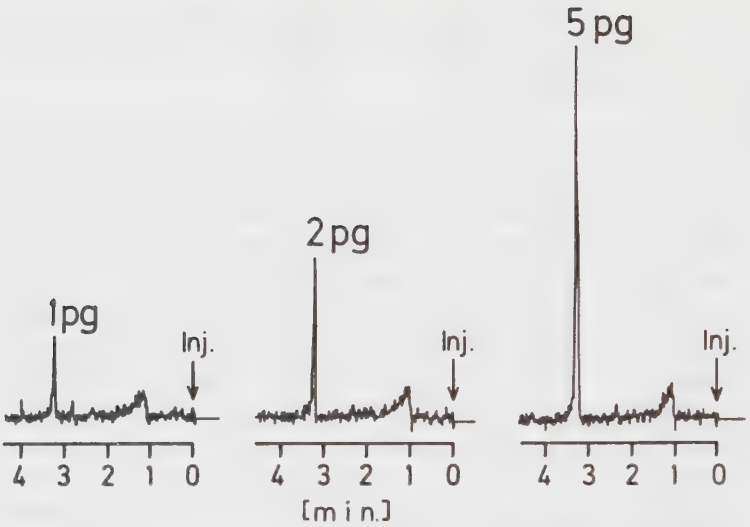

Abb. 6 : Nachweis von 1pg, 2pg und 5pg N-Dimethylthiophosphinylanilin durch Massenfragmentographie

Bedingungen : 30 m Quarzkapillarsäule DB-1
190° C isotherm,
Detektierte Masse m/z 185,0 .

Die außergewöhnliche Spezifität der Massenfragmentographie im Vergleich zum FID zeigt die Gegenüberstellung der beiden Detektionsmöglichkeiten am Beispiel einer Urinprobe, die 50 ng/ml Anilin enthält (s. Abb. 7).
Wichtig bei der Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie ist auch eine optimale Kopplung der beiden Systeme. Die offene Kopplung mit der Ionenquelle des Massenspektrometers durch eine 50 cm lange Glaskapillare nach einer modifizierten Methode von HENNEBERG et al. (30) erwies sich als günstig. Der Hauptvorteil liegt darin, daß an der Kopplungsstelle Atmosphärendruck herrscht, die Trennleistung der GC-Säule damit unbeeinflußt bleibt und die Kontamination der Ionenquelle durch Lösungsmittel bzw. leichtflüchtigere Substanzen mit einer sogenannten Lösungsmittelausblendung vermieden werden kann.

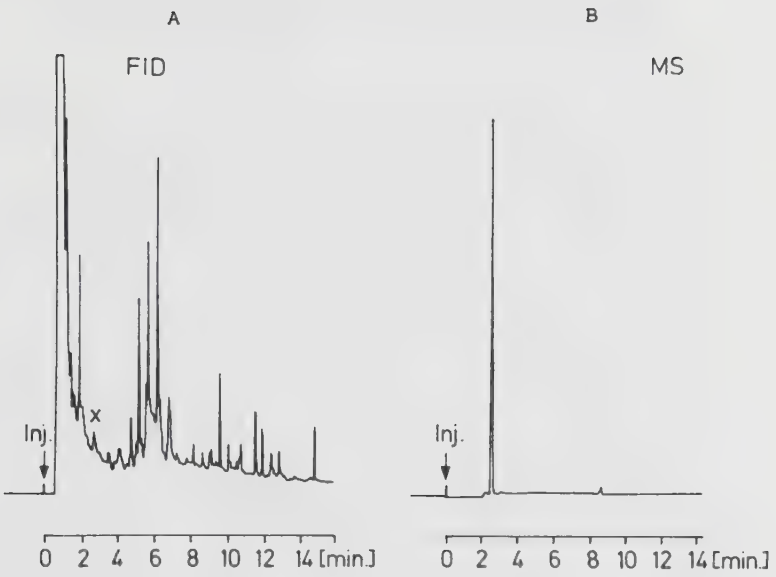

Abb. 7 : FID-Kapillargaschromatogramm (A) und Massenfragmentogramm (B) eines derivatisierten Urinextraktes .

Anilingehalt : 50 ng/ml

GC-MS-Bedingungen : 25 m SE-30 Glaskapillarsäule,
190°C isotherm,
Splitverhältnis 1 : 10,
Injektor 260° C,
Interface 270° C,
Quelle 200° C,
Emission 1 mA, 70 eV,
R = 2000,
Detektierte Masse m/z 185

2.6 Anwendung des Derivatisierungsverfahrens auf die quantitative Bestimmung von Anilin aus Wasser, Serum und Urin

Da Anilin, wie bereits in der Einleitung erwähnt, in der Umwelt nur im ng/ml- bis pg/ml-Bereich vorkommt, war es nötig das Derivatisierungsverfahren für die Bestimmung von Anilin auch im Mikromaßstab aus komplex zusammengesetztem Untersuchungsmaterial zugänglich zu machen. Dabei sollten geeignete Extraktionsverfahren für die Bestimmung aus Wasser, Serum und Urin entwickelt werden.
Diese Vorversuche wurden mit einer radioaktiven (U-^{14}C)-Anilinlösung, die auch stummes Anilin enthielt,nach der in 3.4.1 beschriebenen Weise durchgeführt. Es galt dabei, sowohl die Verluste aus der Einengung allein wie auch aus der Extraktion und Einengung zusammen zu bestimmen.
Nach viermaliger Wiederholung jedes Versuches wurde ein Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse sind aus den Tabellen 3, 4 5 und 6 zu ersehen und werden im Folgenden näher dargestellt.

2.6.1 Bestimmung der Wiederfindung von Anilin nach Einengung aus organischen Lösungsmitteln

Das zu bestimmende Anilin muß zuerst aus den wässrigen Lösungen (Wasser, Serum und Urin) extrahiert werden, da Wasser die Derivatisierung mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid unmöglich macht. Es war daher nötig, die Einengung der verwendeten Lösungsmittel zu optimieren. Dafür kommen drei verschiedene Verfahren in Frage :

A. Einengung durch Abblasen mit einem leichten Stickstoffstrom (3.4.1.1).

B. Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (3.4.1.2).

C_1/C_2. Schonende Evakuierung im Exsiccator mit bis zu 2ml Lösungsmittel in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (3.4.1.3)

Um die Flüchtigkeit des freien Anilins zu verringern wurden verschiedene Säuren wie Salzsäure, Schwefelsäure, Oxalsäure und Phosphorsäure zugesetzt.
Die Phosphorsäure ist am besten geeignet, da sie die Derivatisierung und Detektion nicht stört (JACOB (34)).
Um den Einfluß der Phosphorsäure auf die Wiederfindungsrate zu demonstrieren, wurde die Einengung im Exsiccator mit (C_1) und ohne (C_2) Phosphorsäure durchgeführt (Tab.3).

Tab. 3 : Wiederfindungsraten (%) von Anilin nach Einengung bei verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	A	B	C_1	C_2
Ethylacetat	62 %	64 %	65 %	33 %
Methylenchlorid	71 %	82 %	86 %	38 %
Diethylether	77 %	83 %	87 %	35 %
n-Hexan/Methylenchlorid 8/2	85 %	88 %	90 %	36 %

A = im leichten Stickstoffstrom mit H_3PO_4-Zusatz eingeengt
B = am Rotationsverdampfer mit H_3PO_4-Zusatz eingeengt
C_1 = im Exsiccatorvakuum mit H_3PO_4-Zusatz eingeengt
C_2 = im Exsiccatorvakuum ohne H_3PO_4-Zusatz eingeengt

Wie aus dem Vergleich von C_1 und C_2 ersichtlich wird, steigert der Zusatz von Phosphorsäure die Ausbeute von Anilin bei der Einengung auf das zwei- bis dreifache.
Ethylacetat führte in allen drei Verfahren zu den größten Verlusten. Die anderen Lösungsmittel verhielten sich annähernd gleich, wobei das Gemisch n-Hexan / Methylenchlorid (8/2) nach der Einengung im Exsiccatorvakuum die besten Ergebnisse lieferte.
Dieses Verfahren ist nur für kleine Mengen an Serum und Urin geeignet (s. Kap. 2.6.2.3), da nur kleine Volumina in einem vernünftigen Zeitraum im Exsiccator eingeengt werden können.

Die wässrigen Proben mußten wegen der größeren Lösungsmittelmengen (3 x 20 ml) im gleichen Lösungsmittelgemisch am Rotationsverdampfer eingeengt werden.

2.6.2 Bestimmung der Wiederfindung von Anilin nach Extraktion aus wässrigen Lösungen, Urin und Serum mit anschließendem Einengen

Nachdem nun das geeignete Einengungsverfahren gefunden war, galt es das Extraktionsverfahren aus wässrigen Lösungen zu optimieren. Wiederum wurde dazu eine ^{14}C-Anilinlösung (3.4.1) für die Ausbeutebestimmung verwendet.

2.6.2.1 Extraktion von Anilin mit Extrelut^{R}

Aus der Literatur (JACOB (34)) war die Extraktion von Anilin mit Extrelut^{R}-Kieselgur-Säulen bekannt. Dieses Adsorptionsmaterial hatte bereits für die Isolierung von Steroiden aus Plasma (VOGT et al. (56)) recht gute Ergebnisse erbracht. Deshalb sollten die Extraktionsausbeuten (Tab. 4) damit als erstes bestimmt werden (3.4.2.1).

Tab. 4 : Extraktion von Anilin mit Ethylacetat an Extrelut^{R}-Kieselgur und anschließende Einengung im Exsiccatorvakuum (3.4.2.1)

	I	II
Wasser	90 %	58 %
Urin	64 %	26 %
Serum	71 %	24 %

Die Ausbeuten (%) wurden wie in Tab. 3 ermittelt.
I = vor Einengung im Exsiccatorvakuum
II= nach Einengung im Exsiccatorvakuum

Die Ausbeuten für Urin und Serum lagen deutlich unter denen für Wasser. Die extremen Verluste nach Einengung trotz Zusatz von Phosphorsäure können auf im Urin und Serum enthaltene Stoffe zurückgeführt werden, welche entweder die Austragung von Anilin erleichtern oder die Phosphorsäure vollständig binden, so daß keine Salzbildung mehr möglich ist.
Aus in gleicher Weise vorgenommenen Versuchen mit unmarkiertem Anilin und anschließender Derivatisierung (3.3.2) konnte selbst mit Mikrogramm-Mengen kein N-Dimethylthiophosphinylanilin mittels GC-MS nachgewiesen werden. Somit scheinen die Urin- bzw. Serumproben nach der Extraktion außerdem noch Substanzen zu enthalten, die die Derivatisierung unterbinden. Dieses Verfahren schied daher für die Probenvorbereitung aus.

2.6.2.2. Extraktion von Anilin mit Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäulen

Vor kurzem entwickelte die Firma Waters (Milford, MA,USA) kleine Fertigsäulen (Sep-Pak-C_{18}), die nach Art der Flüssigkeitschromatographie Substanzen aus wässrigen Lösungen von einer Matrix gut abtrennen und in organische Lösungen überführen. Bisher ist die Anwendung dieses Verfahrens zur Aufreinigung von Serum-, Plasma- und Urinproben in der Literatur nur wenig beschrieben (AXELSON et al. (2), CANFELL et al. (11), FASCO et al. (22), HARTWICK et al. (28), NARASIMHACHARI (45)).
Bei dieser Methode wurde die wässrige Probe mit einer Spritze durch die Säule gepreßt. Anschließend wird mit 1 ml Wasser nachgewaschen. Die Ausbeute von Säulendurchlauf und wässriger Elution wurde gemeinsam bestimmt (Tab. 5a). Substanzen wie Anilin werden mit 2 ml Methylenchlorid (b) und anschließend 2 ml Methanol (c) eluiert.

Da eine gute Trennung von wässriger und organischer Phase aufgrund des Totvolumens der Säule schlecht möglich war, mußte nach jeder Elution das noch gebundene Elutionsmittel mit Luft entfernt werden.
Während alle Eluate direkt gemessen wurden, bestimmte man zusätzlich bei der Methylenchloridelution die Ausbeute nach Einengen im Exsiccatorvakuum, um auch diese Verluste abschätzen zu können (Tab. 5, b_2).

Tab 5 : Extraktion von Anilin an einer Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäule (Wiederfindungsraten in %)

Elutionsmittel	Wasser a	Methylenchlorid b_1	b_2	Methanol c	Gesamtausbeute
Probe					
Wasser 3 ml	4 %	92 %	(83 %)	2 %	98 %
Serum 3 ml	1 %	84 %	(35 %)	6 %	91 %
Urin 3 ml	1 %	70 %	(31 %)	3 %	74 %

a = Säulendurchlauf und Elution mit 1 ml Wasser
b_1 = Elution mit 2 ml Methylenchlorid, b_2 nach Einengen im Exsiccatorvakuum
c = Elution mit 2ml Methanol

Durch die Elution mit Methylenchlorid wird der überwiegende Teil des aufgetragenen ^{14}C-Anilins vom Sep-Pak eluiert.
Die Verluste, die in den Eluaten a sowie c auftraten, können vernachlässigt werden. Es wurden für sämtliche Versuche jeweils neue Sep-Pak-Fertigsäulen verwendet, da bei Urin größere Mengen an Anilin (74 % Gesamtausbeute) und offensichtlich auch anderen Substanzen (Gelbfärbung der Sep-Pak-Säule) irreversibel gebunden wurden.
Wie bei den Versuchen mit Extrelut^R-Kieselgur war die Ausbeute für Anilin aus Urin und Serum nach der Einengung im Exsiccatorvakuum auch hier drastisch gesenkt (Tab. 5, Spalte b_2)

Die Gründe für diese Verluste dürften bei der Sep-Pak-Extraktion ebenfalls die in Urin und Serum enthaltenen Substanzen sein, wie bereits bei Extrelut diskutiert wurde.
Mehrmalige Versuche von Trennungen über Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäulen mit unmarkiertem Anilin, anschließender Derivatisierung und Nachweis durch GC-MS schlugen fehl. Die Ursache dafür dürfte darin liegen, daß beim Durchdrücken der Methylenchloridphase noch Wasserreste mitgerissen werden, welche selbst nach Einengung im Exsiccatorvakuum nicht vollständig entfernt werden konnten und damit die Derivatisierung unterbanden. Daher schied auch dieses Extraktionsverfahren für die Anilinbestimmung im Mikromaßstab aus.

2.6.2.3 Extraktion von Anilin durch Ausschütteln

Die bisher beschriebenen Extraktionsverfahren waren wenig befriedigend, so daß die herkömmliche Extraktion durch Ausschütteln, trotz der größeren Volumina an organischen Lösungsmitteln, am ehesten erfolgversprechend schien. Dieses Verfahren (3.4.2) bereitete allerdings bei Serum und Urin einige Schwierigkeiten, da sich oft durch das Ausschütteln mit allen verwendeten Lösungsmitteln eine gallertartige Zwischenschicht bildete. Um diesen durch Bestandteile des Serums und Urins bedingten Effekt zu unterdrücken, wurde die Extraktion im Kühlraum mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Es wurden 3 x 20 ml für die Wasserproben bzw. 3 x 1 ml für die Serum- und Urinproben an Extraktionsmittel verwendet (Tab. 6).
Ethylacetat ergab bereits bei der Wasserprobe sehr niedrige Wiederfindungsraten, so daß auf die Extraktion von Serum und Urin mit diesem Lösungsmittel verzichtet wurde.

Obwohl die Ergebnisse für Ether und n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) vergleichbar sind, wurde zur Extraktion wegen der anschließenden Derivatisierung das letztere Lösungsmittelgemisch verwendet.

Tab. 6 : Extraktion von Anilin durch Ausschütteln und anschließende Einengung im Exsiccatorvakuum

Extraktionsmittel	Ethylacetat	Diethylether		n-Hexan/Methylenchlorid (8/2)	
	I	I	II	I	II
Probe					
Wasser 100 ml	72 %	92 %	80 %	91 %	80 %
Serum 3 ml	n.b.	84 %	42 %	85 %	54 %
Urin 3 ml	n.b.	88 %	38 %	86 %	40 %

Die angegebenen Ausbeuten (%) wurden wie in Tab. 3 ermittelt.
I = vor Einengung im Exsiccatorvakuum
II= nach Einengung im Exsiccatorvakuum
n.b. = nicht bestimmt

Die Ausbeuten an Anilin für Serum und Urin nach der Einengung lagen deutlich über denen der zuvor beschriebenen Verfahren, waren aber dennoch für einen Einsatz im Mikromaßstab nicht befriedigend.
Um einen Quench der ^{14}C-Anilin-Ausbeuten durch aus Serum oder Urin kommende Substanzen auszuschließen, wurde das Serum bzw. der Urin ohne Anilin in gleicher Weise extrahiert und erst dann die ^{14}C-Anilinlösung zugesetzt.
Die cpm-Werte der ^{14}C-Anilinlösung und die cpm-Werte der ^{14}C-Anilinlösung plus der Serum- bzw. Urinextrakte waren gleich, so daß ein Quench für die beobachteten Ausbeuteverluste aus-

geschlossen werden konnte. Um die Anilinverluste beim Einengen der Extraktionslösung aus Serum und Urin zu verringern, wurden die Proben nach der Extraktion durch Ausschütteln mit n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) nicht vollständig mit Stickstoff zur Trockene, sondern nur bis zu einem Restvolumen von 100 µl Lösung eingedampft.
Durch diese Vorgehensweise konnte die Ausbeute bei Urin von 40 % auf 69 % und bei Serum von 54 % auf 74 % verbessert werden. Durch Behandeln dieser Restlösung mit Molekularsieb 4 Å ließen sich sowohl Spuren von Wasser als auch das durch die Zugabe von Phosphorsäure eingetragene Methanol binden. Somit konnte eine direkte Derivatisierung der Proben ohne vollständiges Eindampfen ermöglicht werden.

2.7 Kriterien für die Wahl eines internen Standards

Da bei einer aufwendigen Probenaufbereitung bis zur Derivatisierung einer quantitativ zu bestimmenden Substanz, wie hier im Falle des Anilins, immer ein Teil verloren geht, ist eine interne Standardisierung erforderlich. Es werden dadurch auch Verluste, die bei der Derivatisierungsreaktion selbst (Nebenprodukte) sowie bei der anschließenden gaschromatographischen Trennung und der massenfragmentographischen Detektion auftreten, kompensiert.
Der interne Standard muß als wesentliche Voraussetzung in seinen chemischen Eigenschaften, wie z.B. der Flüchtigkeit und der Reaktivität, der zu bestimmenden Substanz weitgehend ähnlich sein. Im Falle des Anilins bietet sich das am Benzolring fünffach deuterierte Anilin besonders an. Dieses Produkt ist zudem kommerziell erhältlich. Die beiden Verbindungen sollen im Massenfragmentogramm vollständig und problemlos unterschieden werden können.

Die Proben werden demnach alle mit einer genau definierten Menge an D_5-Anilin versetzt. Durch die Bildung des Verhältnisses von detektiertem Anilinderivat zu D_5-Anilinderivat kann dann auf die zu bestimmende Anilinmenge in der untersuchten Probe zurückgeschlossen werden.
Die massenfragmentographische Überprüfung der Isotopenreinheit der Ausgangsverbindungen D_o- und D_5-Anilin über die jeweiligen N-Dimethylthiophosphinylderivate ergab einen D_5-Gehalt von 0,03 % bei D_o-Anilin und einen D_o-Gehalt von 0,3 % bei D_5-Anilin.

2.8 Charakterisierung des angewendeten Bestimmungsverfahrens für Anilin.

Die optimalen Bedingungen für die Extraktion, Einengung und Derivatisierung sind im Analysenschema (Abb. 8) zusammengestellt. Die Gesamtausbeuten, insbesondere für Urin und Serum, sind starken Schwankungen, zum Teil bis zum Faktor 10, unterworfen. Durch Verwendung von penta-Deuteroanilin als internem Standard ließen sich die Schwankungen , hervorgerufen durch Extraktion, Einengung und Derivatisierung, jedoch vollständig kompensieren.
Die Abb. 9 zeigt exemplarisch die Massenfragmentogramme einer 100 ml Wasserprobe, wobei die Probe in der Abb. 9A nur mit D_5-Anilin aufgestockt wurde, während die Probe in der Abb. 9B zusätzlich noch 100 pg/ml D_o-Anilin enthielt. Der kleine D_o-Peak in Abb. 9A (Leerprobe) entspricht dem D_o-Anteil von D_5-Anilin und beträgt 0,3%.

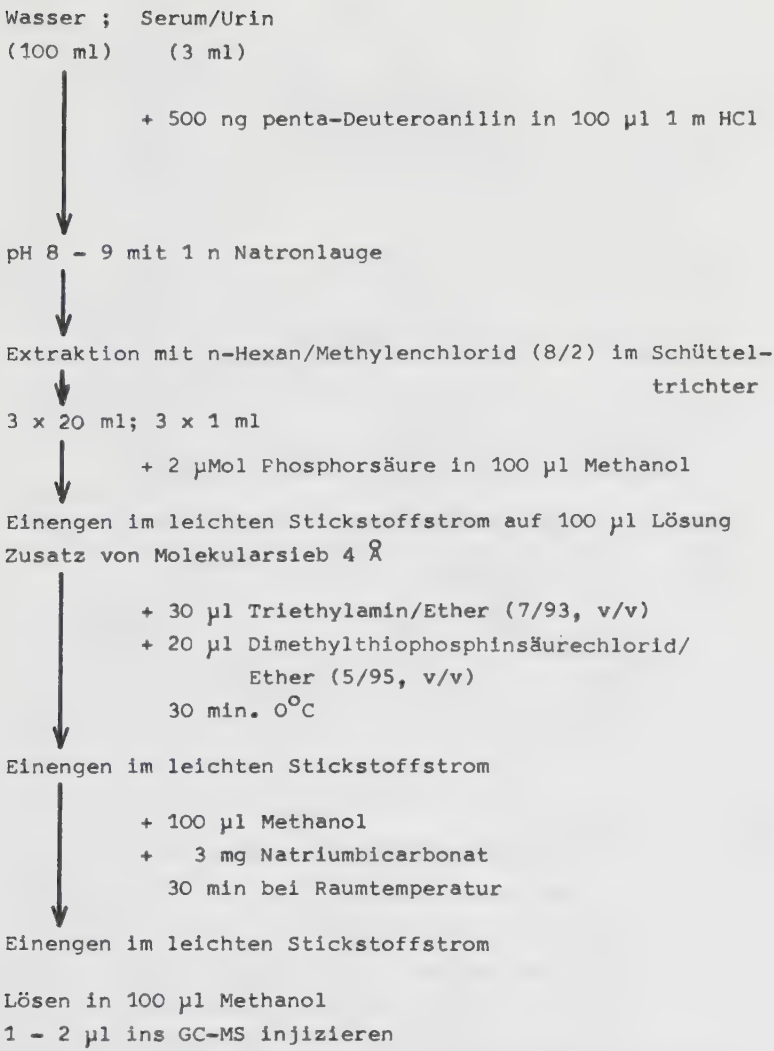

Abb. 8 : Analysenschema für die gaschromatographisch-massenfragmentographische Bestimmung von Anilin aus Wasser, Urin und Serum

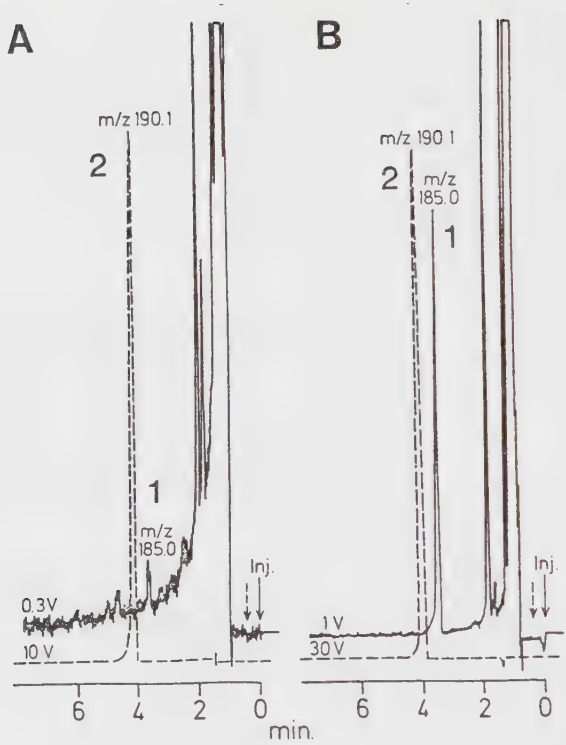

Abb. 9 : Massenfragmentogramm einer Wasserprobe

A = Leerprobe
B = Wasserprobe aufgestockt mit 100 ng/ml Anilin

GC-MS-Bedingungen : 25 m SE-30 Glaskapillarsäule (190°C), detektierte Ionen m/z 185, m/z 190

1 = D_o-Anilinderivat; 2 = D_5-Anilinderivat (als interner Standard)

2.8.1 Linearität der Methode

Die Linearität des Verfahrens wurde im Bereich von 5-500ng überprüft. Als interner Standard dienten jeweils 500 ng penta-Deuteroanilin. Die Werte für die Bezugskurven wurden aus den Mittelwerten von Doppelbestimmungen gebildet (Abb. 9, 10, 11).
Die Bezugskurven zeigen für Wasser, Urin und Serum über den gesamten Meßbereich von 0,05 bis 5 ng/ml bei Wasser bzw. von 1,6 bis 166 ng/ml bei Urin und Serum eine strenge Linearität.
Die Korrelationskoeffizienten lagen für Wasser bei r = 0,9976, für Serum bei 0,9969 und für Urin bei 0,9988.

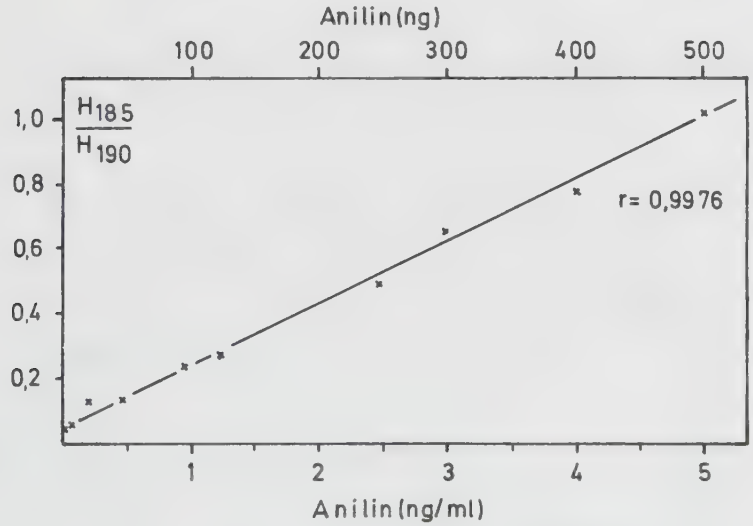

Abb. 10 : Bezugskurve für die massenfragmentographische Bestimmung von Anilin aus Wasser

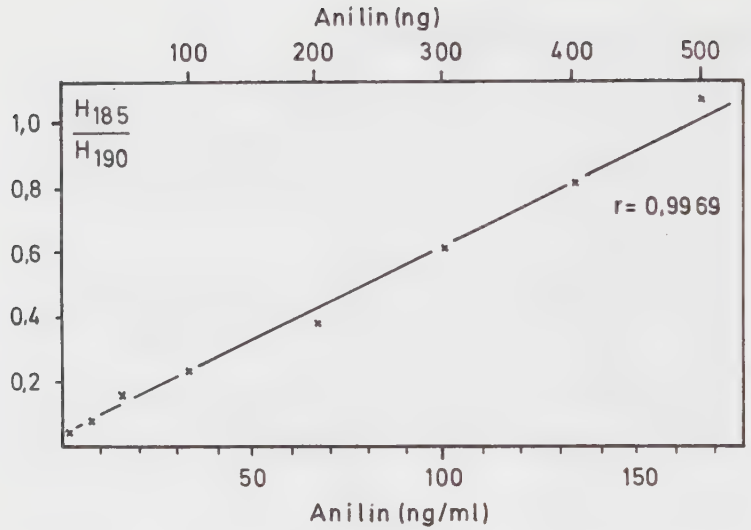

Abb. 11 : Bezugskurve für die massenfragmentographische Bestimmung von Anilin aus Serum

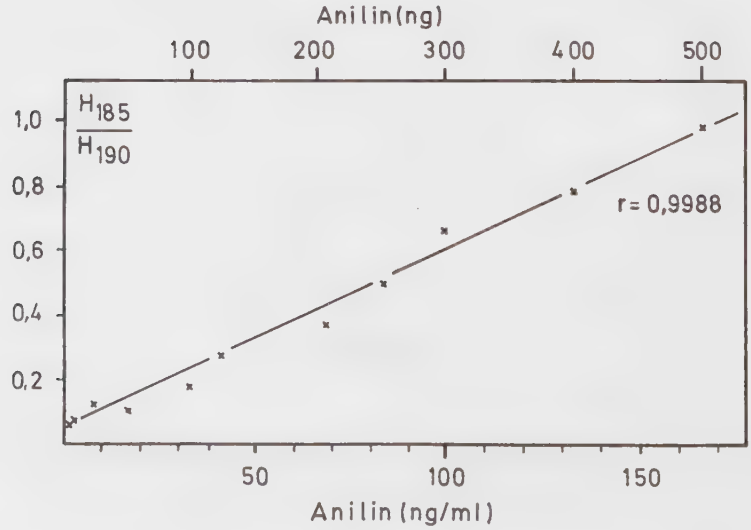

Abb. 12 : Bezugskurve für die massenfragmentographische Bestimmung von Anilin aus Urin

Für kleine Anilinmengen von 5 und 10 ng (entsprechend 50 und 100 pg/ml in Wasser und 1,6 und 3,2 ng/ml in Serum und Urin) wurden teilweise höhere Peakhöhenverhältnisse als erwartet, beobachtet. Dies kann nicht ausschließlich durch die Verunreinigung von Anilin durch penta-Deuteroanilin bzw. umgekehrt (2.8) erklärt werden.
Diese Abweichung konnte bei der Direktumsetzung (3.3.2) nicht bestätigt werden, so daß auch ein H/D-Austausch nicht in Erwägung gezogen werden kann. Die höheren Absolutwerte bei den kleinen Konzentrationen können durch das stärkere Untergrundrauschen, welches durch die Probenaufbereitung verursacht wird, mehr ins Gewicht fallen.

2.8.2 Präzision der Methode

In der unter 3.5.0 beschriebenen Weise wurden mehrere Proben gleicher Anilinmengen (D_o/D_5-Anilin) unabhängig voneinander und auch an verschiedenen Tagen analysiert (Tab. 7).

Tab. 7 : Präzision des Verfahrens für Wasser, Serum und Urin
Sämtliche Proben enthielten 500 ng D_5-Anilin und die jeweils angegebene Menge an D_o-Anilin.
V_K = Variationskoeffizient

	eingesetzte Menge Anilin	Anzahl der Proben	V_K
Wasser 100 ml	500 ng	9	10,1 %
Serum 3 ml	500 ng	12	12,2 %
Urin 3 ml	500 ng	9	7,3 %

Die Variationskoeffizienten betragen circa 7 - 12 %. Gründe für diese Unterschiede dürften zum einen in der Ungenauigkeit des Pipettierens, zum anderen in den Abweichungen der GC-MS-Analyse liegen.
Daß die letzteren vorhanden sind, konnte durch mehrmaliges Einspritzen ein und derselben Lösung am selben Tage gezeigt werden. Dabei fand man bei Wasser Variationskoeffizienten zwischen 1,7 ; 3,5 und 11,3 % und für Serum von 7,5 %.

2.8.3 Nachweisgrenze der Gesamtmethode

Die praktische Nachweisgrenze des Verfahrens gibt diejenige Konzentration von Anilin in Wasser, Serum und Urin in ng/ml an, die noch nach der Derivatisierung, Abtrennung und Detektion bestimmt werden kann. Sie liegt für Wasser bei 50 pg/ml, für Serum und Urin bei 1,3 ng/ml. Alle bisher publizierten analytischen Bestimmungsverfahren weisen eine höhere Nachweisgrenze auf, die maximal im ng/ml-Bereich liegt (COUTTS et al. (15), BRADWAY und SHAFIK (9)).
In der vorliegenden Nachweisgrenze sind die Verluste durch die Probenaufbereitung (Extraktion, Einengung und Umfüllen), Ausbeute der Derivatisierungsreaktion und Aufreinigung der gesuchten Verbindung (Adsorption im GC-MS und Split am GC) schon eingeschlossen.

2.8.4 Richtigkeit und Spezifität der Methode

Das als interner Standard eingesetzte penta-Deuteroanilin ermöglicht eine vollständige Kompensation der bei der Extraktion und Derivatisierung auftretenden Verluste.
Der substanzspezifische massenspektrometrische Nachweis führt zu einem Höchstmaß an Richtigkeit bei der Detektion.
Die große Trennleistung der verwendeten Quarzkapillarsäulen gewährleistet eine hohe Spezifität der Methode.

2.9 Anwendung des Verfahrens auf verschiedene Abwässer

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, von der Industrie Blut- oder Urinproben von anilinexponierten Personen zu erhalten. Um die Praktikabilität des Verfahrens dennoch zu demonstrieren, wurden daher Abwässer aus einer kommunalen Kläranlage, sowie Münchner Leitungswasser eingesetzt. Es konnten keine Anilinmengen im Nachweisbereich der Methode sowohl im Trinkwasser wie auch in den Abwässern nach mechanischer bzw. mechanischer und biologischer Klärung ermittelt werden.
Trotzdem wurden die Abwässer auf das Vorliegen von den Nachweis störenden Substanzen hin untersucht. Dazu wurde das Abwasser mit verschiedenen Anilinmengen aufgestockt und analysiert. Es konnte keine Abweichung bezüglich der Linearität des Verfahrens beobachtet werden. Daher sind keine Schwierigkeiten bei der Analytik von verschiedensten Wasserproben zu erwarten. Die Methode ist daher nicht nur in der Arbeitsmedizin sondern auch innerhalb des Umweltschutzes einsetzbar.

2.10 Wertung des Verfahrens

Die vorgestellte Isotopenverdünnungsmethode kann als derzeit sicherstes Bestimmungsverfahren zur Quantifizierung von Anilin aus Körperflüssigkeiten und Abwässern betrachtet werden, die eine äußerst niedrige Nachweisgrenze bis in den pg/ml-Bereich zeigt. Der Einsatz des Derivatisierungsreagenzes Dimethylthiophosphinsäurechlorid, welches eine gute Lagerbeständigkeit besitzt und leicht kommerziell erhältlich ist, führt zu einheitlichen Umsetzungsprodukten, wodurch die Nachteile der bisher verwendeten Reagenzien umgangen werden konnten.
Diese bestanden in geringen Ausbeuten bei der Derivatisierungsreaktion, wobei die Abtrennung der Nebenprodukte und des überschüssigen Reagenzes unbefriedigend blieb. Das führte wiederum zu einer höheren Nachweisgrenze, die zudem durch die Hydrolyseempfindlichkeit der teils wenig stabilen Derivate beeinflußt wurde. Allerdings erfordert die beschriebene Methode einen hohen apparativen Aufwand (GC-MS), so daß ein Routineeinsatz zentralen Laboratorien vorbehalten bleibt.

3.0 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Geräte

3.1.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer Modell 311 A (Varian MAT, Bremen) durch Elektronenstoßionisation aufgenommen. Die Ionenquellentemperatur lag bei 200°C. Die Detektion der Molekülionen nach der gaschromatographischen Auftrennung erfolgte mit Hardware-MIS bei folgenden Gerätedaten :

Emission der Elektronenstoßionenquelle	1000 µA
Elektronenenergie	70 eV
Geradeauseinlass	160°C
Kapillarleitung	150°C
Vakuumanzeige	7×10^{-6} Torr
Sekundärelektronenvervielfacher	1,6 KV
Auflösung	1000

3.1.2 Gaschromatographie

Als Gaschromatograph diente ein Gerät 1440 der Firma Varian (Darmstadt). Die Trennung wurde an einer 25m-Glaskapillarsäule SE 30 mit einem Volumen von 2,5 ml bzw. einer 30 m DB-1 Quarzglassäule durchgeführt. Die GC-Säulen wurden über eine offene Kopplung (50 cm Glaskapillarleitung) mit der Ionenquelle des Massenspektrometers verbunden.

Säulenflow	3 ml/min.
Säulentemperatur	190°C
Septumsplit	2 ml/min.
Flow am Split	30 ml/min.
Splitverhältnis	1 : 10
Spülgas Helium (offener Split)	30 ml
Injektortemperatur	250° C

3.1.3 Szintillationsmessung

Als β-Szintillationszähler wurde das Modell LKB 1210 (LKB, Upsala, Schweden) mit dem externen Standard Radium 226 verwendet. Der Szintillationscocktail wurde nach der Vorschrift von BRAY (10) angesetzt.

60 g	Naphthalin (Merck, Darmstadt)
4 g	PPO = 2,5-Diphenyloxazol (Merck, Darmstadt)
200 mg	POPOP = 2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol) (Merck, Darmstadt)
20 ml	Ethylenglykol (Merck, Darmstadt)
100 ml	Methanol p.a. (Merck, Darmstadt)
ad 1l	Dioxan ROTISZINT (Roth, Karlsruhe)

3.2 Chemikalien

Sämtliche Lösungsmittel wurden als p.a. Ware eingesetzt. Diethylether und n-Hexan wurden vor ihrer Verwendung noch jeweils über Natrium vorgetrocknet.
Dimethylthiophosphinsäurechlorid (Riedel de Haën, Seelze) wurde nach Destillation und Aufbewahrung unter Stickstoff eingesetzt. Des weiteren wurden verwendet :
Triethylamin p.a. (Merck, Darmstadt) ; Extrelut-Kieselgur (Merck, Darmstadt), Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäulen (Waters Associates Inc., Königstein), Molekularsieb 4 Å (Merck, Darmstadt), und D_o- bzw. D_5-Anilin (Deuterierungsgrad 99%) (Merck, Darmstadt).
Die Seren und Urinproben mehrerer Patienten aus unserem Routinelabor wurden zu einem Serum- und Urinpool vereinigt.
Als radioaktives Anilin wurde (U-^{14}C)-Anilin-HCl (spez. Akt.: 10 mCi/mmol) gelöst in Ethanol (NEN, Dreieichenhain) verwendet.

3.3 Derivatisierung von Anilin mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid

3.3.1 Präparative Darstellung von N-Dimethylthiophosphinyl-anilin und des penta-Deuteroanilinderivates

Zu einer Lösung von 0,37 g (4 mMol) Anilin bzw. penta-Deuteroanilin und 0,60 g (6 mMol) Triethylamin in 10 ml trockenem CCl_4 werden 0,67 g (5 mMol) Dimethylthiophosphinsäurechlorid in einer Stickstoffatmosphäre und unter Eiskühlung langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 60 min. bei 0°C gerührt und dann 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen.
Danach engt man am Rotationsverdampfer zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in wenig Benzol-Petrolether auf, filtriert unlösliche Salze ab und kristallisiert im selben Lösungsmittelgemisch um.

N-Dimethylthiophosphinylanilin :
Farblose Kristalle, Schmelzpunkt 115°C (Lit. 117°C)
Ausbeute : 0,71g (75% der Theorie)
N-Dimethylthiophosphinyl-penta-Deuteroanilin :
Elfenbeinfarbene Kristalle, Schmelzpunkt 114° C,
Ausbeute : 0,62g (66% der Theorie)

3.3.2 Analytische Derivatisierung von Anilin und penta-Deuteroanilin-Gemischen mit Dimethylthiophosphinsäurechlorid

Nach einer Modifikation der Vorschrift von JACOB (34) werden 5 - 500ng Anilin und 500 ng penta-Deuteroanilin in 100 µl vorgetrocknetem CCl_4 gelöst. Dazu gibt man unter Eiskühlung 30 µl 7% Triethylamin-Lösung in Diethylether (v/v), sowie 20 µl 5% Dimethylthiophosphinsäurechlorid in Diethylether (v/v) und läßt die Lösung 30 min. bei 0°C stehen. Danach wird im Stickstoffstrom zur Trockene eingeengt , der Rückstand mit 50 µl Methanol aufgenommen, wenige Kristalle Natriumbicarbonat zugegeben und 30 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wird transferiert, mit Stickstoff eingeengt und zur GC-MS-Analyse wieder in 100 µl Methanol gelöst.

3.4 Aufbereitungsverfahren der Proben zur Derivatisierung

3.4.1 Einengung von Anilin aus einer organischen Phase

Zur Optimierung der Anreicherung von Anilin aus organischen Phasen werden 150 µl einer ^{14}C-Anilinlösung folgender Zusammensetzung verwendet :

(U-^{14}C)-Anilinlösung (10 mCi/mmol = 33500 dpm; gelöst in 50 µl Ethanol)

D_o-Anilinlösung (300 ng gelöst in 100 µl des jeweiligen Lösungsmittels: Methylenchlorid, Ethylacetat, Ether, n-Hexan/Methylenchlorid 8/2 (v/v),Wasser.

3.4.1.1 Einengung durch Einblasen im Stickstoffstrom

Zu 10 - 50 ml Lösungsmittel (Methylenchlorid, Ethylacetat,Ether n-Hexan/Methylenchlorid 8/2) wird die in 3.4.1 beschriebene ^{14}C-Anilinlösung zugegeben. Nach Zusatz von 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol werden die Lösungen unter Rühren im kalten Wasserbad mit einem leichten Stickstoffstrom (nur mit Teflonschlauch) zur Trockene gebracht. Die Ausbeute bestimmt man nach Zugabe von 500 µl Aceton im Szintillationszähler.

3.4.1.2 Einengung am Rotationsverdampfer

In 10 - 50 ml der unter 3.4.1.1 genannten Lösungsmittel wird die oben beschriebene ^{14}C-Anilinlösung zugesetzt. Zusammen mit 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol werden die Lösungen anschließend in einem Spitzkolben am Rotationsverdampfer im kalten Wasser bis zur Trockene einrotiert. Die Ausbeutenbestimmung erfolgte ebenfalls durch Szintillationszählung.

3.4.1.3 Eindampfung im Exsiccatorvakuum

Die ^{14}C- Anilinlösung und 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol werden in extragroße Eppendorf-Reaktionsgefäße (3 ml) in 2 ml der unter 3.4.1.1 genannten Lösungsmittel zugegeben. In die Deckel wird ein kleines Loch gestanzt. Dann stellt man diese Gefäße in den Exsiccator und zieht mit Wasserstrahlvakuum das Lösungsmittel ab. Die Ausbeute wird analog 3.4.1.1 ermittelt.

3.4.2 Extraktion von Anilin aus wässrigen Lösungen

3.4.2.1 Extraktion über eine Extrelut^{R}-Kieselgur-Säule

3.4.2.1.1 Extraktion aus Wasser

20 ml Wasser werden mit 150 ml der ethanolischen ^{14}C-Anilinlösung versetzt und mit 0,1 n Natronlauge auf einen pH von 8,0 – 8,5 eingestellt. Diese Lösung wird im Verlauf von 30 Minuten an 75 ml Extrelut^{R} adsorbiert. Das Extrelut^{R} muß aber vor Gebrauch mit 300 bis 500 ml bidestilliertem Methanol, Methylenchlorid und Ethylacetat sorgfältig gereinigt werden. Die Elution erfolgt mit 50 ml Ethylacetat. Ein Aliquot wird dann zur Bestimmung der Ausbeute am Szintillationszähler entnommen, während der Rest nach Zugabe von 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol im Exsiccator zur Trockne eingeengt wird. Auch hiervon wird nach Auflösen in Ethylacetat ein Aliquot zur Ausbeutebestimmung entnommen.

3.4.2.1.2 Extraktion aus Urin und Serum

In analoger Weise (3.4.2.1.1) werden 3 ml Urin bzw. Serum an 10 ml Extrelut^{R} adsorbiert. Die Elution erfolgt mit 10 ml Ethylacetat.

3.4.2.2 Extraktion über Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäulen

Die wässrige ^{14}C-Anilinlösung (3.4.1) wird mit 3 ml Wasser, Urin bzw. Serum versetzt und mit 0,1 n Natronlauge auf einen pH-Wert von 8 - 9 gebracht. Mit einer 10 ml fassenden Spritze, die direkt auf die Sep-Pak-C_{18}-Fertigsäule aufgesetzt ist, gibt man die Lösung langsam unter Druck auf. Das Totvolumen der Säule wird mit nachfolgendem Durchpressen von Luft weitgehend eliminiert. Das Eluat a) wird gesammelt. Nach Aufpressen von 1 ml Wasser verfährt man in gleicher Weise und erhält das Eluat b). 2 ml Methylenchlorid und 2 ml Methanol ergeben die Eluate c) und d). Von den Eluaten a - d wird ein Aliquot zur Ausbeutebestimmung am Szintillationszähler entnommen. Das Eluat c) wird nach Zugabe von 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol im Exsiccatorvakuum eingeengt und mit Ethylacetat aufgenommen. Die Ausbeutebestimmung erfolgt analog 3.4.1.1 .

3.4.2.3 Extraktion im Schütteltrichter

Die wässrige ^{14}C-Anilinlösung (3.4.1) wird in 100 ml Wasser bzw. 3 ml Serum oder 3 ml Urin gelöst und mit Natronlauge (0,1 Mol/l) auf einen pH von 8 bis 9 gebracht. Diese Lösungen werden jeweils 3-mal mit Ethylacetat, Ether oder n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) extrahiert. Die Volumina betragen bei Wasser 3 x 20 ml, bei Serum und Urin 3 x 1 ml. Aus jedem Extraktionsvolumen werden vergleichbare Aliquote am Szintillationszähler gemessen. Der Rest wird nach Zugabe von 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol im Exsiccator getrocknet, in Ethylacetat aufgenommen und die Ausbeute analog 3.4.1.1 ermittelt.

3.5.0 Massenfragmentographische Bestimmung von Anilin nach Derivatisierung

3.5.1 Aus Wasser

100 ml Wasser werden mit 500 ng penta-Deuteroanilin, welche in 100 µl Salzsäure (1 Mol/l) gelöst sind, versetzt und mit Natronlauge (0,1 Mol/l) auf einen pH von 8 bis 9 eingestellt. Das Gemisch wird 3-mal mit je 20 ml n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) extrahiert, vereinigt und nach Zugabe von 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol im leichten Stickstoffstrom bis auf 100 µl eingeengt.
Spuren von Wasser und Methanol werden mit Molekularsieb 4 Å entfernt. Nach Dekantieren in ein 3 ml Glasschliffgefäß gibt man unter Eiskühlung 30 µl 7% Triethylaminlösung in Diethylether (v/v) sowie 20 µl 5% Dimethylthiophosphinsäurechlorid in Diethylether (v/v) zu und läßt die Lösung 30 Minuten bei 0°C stehen. Anschließend engt man mit Stickstoff bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird in 50 µl Methanol aufgenommen, wenige Kristalle Natriumbicarbonat zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
Der Überstand wird wiederum zur Trockene eingeblasen und für die GC-MS-Analyse in 100 µl Methanol aufgenommen.

3.5.2 Aus Serum und Urin

3 ml Urin bzw. 3 ml Serum werden bei 0° C mit 3 x 1 ml n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) extrahiert. Nach Zusatz von 2 µMol Phosphorsäure in 100 µl Methanol wird analog 3.5.1 eingeengt, derivatisiert und in 100µl Methanol zur GC-MS-Analyse aufgenommen.

4.0 ZUSAMMENFASSUNG

Aromatische Amine, unter anderem auch Anilin, werden durch Produktion und Einsatz von Pharmaka, Herbiziden und Fungiziden in immer stärkerem Maße in die Umwelt eingebracht, so daß eine Überwachung der Anilinspiegel innerhalb des Umweltschutzes, der Arbeitsmedizin und auch der Klinischen Chemie daher notwendig ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb ein Bestimmungsverfahren für Ultraspuren von Anilin aus Körperflüssigkeiten und umweltbelasteten Abwässern zu entwickeln. Das Verfahren soll die Kriterien einer guten Reproduzierbarkeit und Linearität bei niedriger Nachweisgrenze erfüllen. Dies ist nur mit der hochempfindlichen Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie möglich, wobei leicht flüchtige Substanzen, wie das Anilin zuvor derivatisiert werden müssen.

Es war bekannt, daß sich Amine und auch Anilin gut mit dem Dimethylthiophosphinsäurechlorid zu N-Dimethylthiophosphinsäureamiden derivatisieren lassen. Diese Derivate sind thermisch und hydrolytisch stabil, können aus komplexen Gemischen mit einer 25 m SE-30 Glaskapillarsäule gut abgetrennt werden und ergeben im Massenspektrometer recht intensive Molekülionen.

Für die Quantifizierung von Anilinspuren aus Wasser, Serum und Urin mußten geeignete Extraktions-, Konzentrierungs- beziehungsweise Einengungsverfahren entwickelt werden, wodurch erst dann die Derivatisierung in der organischen Phase möglich wurde.

Von den Extraktionsverfahren waren die Trennungen über eine Extrelut- und Sep-Pak C_{18}-Säule nicht geeignet, wobei ersteres zu hohe Verluste aufwies und bei letzterem keine vollständige Phasentrennung erreicht werden konnte und damit das noch vorliegende Wasser das Reagenz hydrolysierte.

Durch Ausschütteln mit n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) oder Diethylether konnten Wiederfindungsraten zwischen 84 und 92% erzielt werden.
Die Einengung der organischen Lösungen erfolgte im leichten Stickstoffstrom, im Rotationsverdampfer und im Exsiccatorvakuum, welches für das Lösungsmittel n-Hexan/Methylenchlorid (8/2) unter Zusatz von Phosphorsäure Anilinausbeuten bis zu 90% ergab. Die Zugabe von Phosphorsäure trägt bei all den genannten Einengungsmethoden wesentlich zur Steigerung der Ausbeuten bei. Im optimalen Verfahren wurden die Extrakte nicht ganz zur Trockene eingeengt. Die nach dem Konzentrierungsverfahren noch vorhandenen Restspuren von Wasser konnten durch Zugabe von Molekularsieb entfernt werden, so daß es möglich war, die Derivatisierung wie bei reinem Anilin durchzuführen.
Durch den Einsatz des internen Standards penta-Deuteroanilin wurden die Verluste, welche bei Extraktion, Konzentration und Derivatisierung entstehen,kompensiert.
Das entwickelte Verfahren weist einen Korrelationskoeffizienten im Bereich von 0,05 bis 5 ng/ml von R = 0,9976 für Wasser und im Bereich von 1,6 bis 160 ng/ml von R = 0,9969 für Serum bzw. von R = 0,9988 für Urin auf.
Die Präzision lag je nach eingesetzter Anilinmenge zwischen 7 und 12%. Die Nachweisgrenze für Anilin in Wasser beträgt 50 pg/ml und für Serum bzw. Urin 1,3 ng/ml.
Damit kann die vorgestellte Methode auf die quantitative Analyse von Anilin aus Körperflüssigkeiten und Abwässern bis in den pg/ml-Bereich angewendet werden.

5.0 Literaturverzeichnis

1) ANDERSEN H., und C. BRAESTRUP : Mass fragmentographic demonstration of low amounts of β-phenylethylamine in human urine. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 37, 33 - 37 (1977)

2) AXELSON M., B.-L. SAHLBERG und J. SJÖVALL : Analysis of profiles of conjugated steroids in urine by ion-exchange separation and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. 224, 355 - 370 (1981)

3) BABA S., J. HASHIMOTO, Y. ISHITOYA und Y. FUKUOKA : Measurement of low molecular weight urinary monoamines by gas chromatography. Clin. Chim. Acta 62, 309 - 314 (1975)

4) BECHER G. : Glass capillary columns in the gas chromatographic separation of aromatic amines. II. Application to samples from workplace atmospheres using nitrogen-selective detection. J. Chromatogr. 211, 103 - 110 (1981)

5) BERTANI L.M., S.W. DZIEDZIC, D.D. CLARKE und S.E.GITLOW : A gas-liquid chromatographic method for the separation and quantitation of normetanephrine and metanephrine in human urine. Clin. Chim. Acta 30, 227 - 233 (1970)

6) BLAU K. und J.M. CLAXTON : Urinary phenylethylamine excretion: gas chromatographic assay with electron-capture detection of the pentafluorobenzoyl derivatives. J. Chromatogr. 163, 135 - 142 (1979)

7) BOCK U.E. und P.G. WASER : Gas chromatographic determination of some biogenic amines as their pentafluorobenzoyl derivatives in the picogram range and its applicability to biological materials. J. Chromatogr. 213, 413 - 428 (1981)

8) BOWMAN M.C. und M. BEROZA : Determination of Niagara NIA-10242 and its phenol degradation product in corn silage and milk and determination of other carbamates by GLC of their thiophosphoryl derivatives. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 50, 926 - 933 (1967)

9) BRADWAY D. E. und T. SHAFIK : Electron capture gas chromatographi analysis of the amine metabolites of pesticides : Derivatization of anilines. J. Chromatogr. Sci. 15, 322 - 328 (1977)

10) BRAY G.A. : A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem. 1, 279 - 285 (1960)

11) CANFELL C., S.R. BINDER und H. KHAYAM-BASHI : Mass fragmentographic quantitation of urinary metanephrine and normetanephrine levels using C_{18} mini column extraction. Clin. Chem. 27, 1057 i (1981)

12) CHAYTOR J.P., B. CRATHORNE und M.J. SAXBY : Gas chromatography and mass spectrometry of some isomeric cyclic amines as their trifluoroacetyl derivatives. J. Chromatogr. 70, 141 - 145 (1972)

13) CHOUDHARY G. : Gas liquid chromatographic determination of toxic diamines in permanent hair dyes. J. Chromatogr. 193, 277 - 284 (1980)

14) COHEN I.C., J. NORCUP, J.H.A. RUZICKA und B.B. WHEALS : Trace determination of phenols by gas chromatography as their 2,4-dinitrophenyl ethers. J. Chromatogr. 44, 251 - 255 (1969)

15) COUTTS R.T., E.E. HARGESHEIMER, F.M. PASUTTO und G.B.BAKER : Analysis of aniline and aminophenols in aqueous solutions using electron capture gas chromatography. J. Chromatogr. Sci. 19, 151 - 155 (1981)

16) DALENE M., L. MATHIASSON und J.A. JONSSON : Trace analysis of free amines by gas liquid chromatography. J. Chromatogr. 207, 37 - 46 (1981)

17) DI CORCIA A. und R. SAMPERI : Gas chromatographic determination at the parts-per-million level of aliphatic amines in aqueous solution. Anal. Chem. 46, 977 - 981 (1974)

18) DI CORCIA A., R. SAMPERI und C. SEVERINI : Improvements in the gas chromatographic determination of trace amounts of aliphatic amines in aqueous solution. J. Chromatogr. 170, 325 - 329 (1979)

19) DOSHI P.S. und D.J. EDWARDS : Use of 2,6-dinitro-4-trifluoromethylbenzenesulfonic acid as a novel derivatizing reagent for the analysis of cathecholamines, histamines and related amines by gas chromatography with electron-capture detection. J. Chromatogr. 176, 359 - 366 (1979)

20) DUMONT J.N., T.W. SCHULTZ und R.D. JONES : Toxicity and teratogenicity of aromatic amines to Xenopus laevis. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 22, 159 - 166 (1979)

21) ERTINGSHAUSEN G., C.W. GEHRKE und W.A. AUE : Ultramicrodetection of amino acids by GLC. Separation Sci. 2, 681 - 689 (1967)

22) FASCO M.J., M.J. CASHIN und L.S.KAMINSKY : A novel method for the quantitation of warfarin and its metabolites in plasma. J. Liquid Chromatogr. 2, 565 -575 (1979)

23) FLOBERG S., P. HARTVIG, B. LINDSTRÖM, G. LÖNNERHOLM und B. ODLIND : Extractive alkylation of 6-mercaptopurine and determination in plasma by gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. 225, 73 - 81 (1981)

24) HAMANO T., A. HASEGAWA, K. TANAKA und Y. MATSUKI : Quantitative analysis of aliphatic secondary amines as their derivatives with benzene sulfonyl chlorid by means of a gas chromatograph equipped with flame photometric detector. J. Chromatogr. 179, 346 - 350 (1979)

25) HAMANO T., Y. MITSUHASHI und Y. MATSUKI : Improved gas chromatographic method for the quantitative determination of secondary amines as sulphonamides formed by reaction with benzene sulfonyl chloride.
J. Chromatogr. 190, 462 - 465 (1980)

26) HARGESHEIMER E.E., R.T. COUTTS und F.M. PASUTTO : Pesticide residues. Gas-liquid chromatographic determination of aniline metabolites of substituted urea and carbamate herbicides in aqueous solution.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 833 - 840 (1981)

27) HAUGEN D.A., M.J.PEAK, K.M.SUHRBLER und V.C.STAMOUDIS : Isolation of mutagenic aromatic amines from a coal conversion oil by cation exchange chromatography.
Anal. Chem. 54, 32 - 37 (1982)

28) HARTWICK R.A., D. van HAVERBEKE, M. McKEAG und P.R. BROWN : Sample preparation techniques prior to HPLC analysis of serum nucleosides and their bases.
J. Liquid Chromatogr. 2, 725 - 744 (1979)

29) HEENAN M.P. und N.K. McCALLUM : A new method for the gas chromatographic detection of phenols.
J. Chromatogr. Sci. 12, 89 - 90 (1974)

30) HENNEBERG D., U. HENRICHS und G. SCHOMBURG : Special techniques in the combination of gas chromatography and mass spectrometry.
J. Chromatogr. 112, 343 - 352 (1975)

31) HOLSTEIN E. : Erkrankungen durch aromatische Nitro- und Aminokörper. In : Baader E.W. Handbuch der gesamten Arbeitsmedizin Bd. II/1 München, Urban und Schwarzenberg (1961)

32) HOSHIKA Y. : Chromatographic determination of lower aliphatic primary amines as their fluorine containing Schiff bases.
Anal. Chem. 49, 541 - 543 (1977)

33) HOSHIKA Y.: Gas chromatographic separation of lower aliphatic primary amines as their sulphur-containing Schiff bases using a glass capillary column. J. Chromatogr. 136, 253 - 258 (1977)

34) JACOB K. : Dimethylthiophosphinsäurechlorid - ein vielseitiges, neues Derivatisierungsreagenz für die Gaschromatographie und die kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Habilitationsschrift, Universität München, Fachbereich Medizin 1979

35) JACOB K., W. VOGT, I. FISCHER und M.KNEDEL : Steroid-Phosphor-Verbindungen: IV. Mitteilung : Synthese von Steroid-Phosphinsäureestern. Tetrahedron Lett. 1975, 1927 - 1930

36) JACOB K., C. FALKNER und W. VOGT : Derivatization method for the high-sensitive determination of amines and amino acids as dimethylthiophosphinic amides with the alkali flame-ionization detector. J. Chromatogr. 167, 67 - 75 (1978)

37) JACOB K., W. VOGT und M. KNEDEL : Dimethylthiophosphinsäure-ester von Hydroxysteroiden. Liebigs Ann. Chem. 1979, 878 - 885

38) KAWAI S. und Z.TAMURA : Gas chromatography of catechol-amines as their trifluoracetates. Chem. Pharm. Bull. 16, 699 - 701 (1968)

39) KHAMOVA S. und K. BOKAREV : Fiziol. Rast. (Moscow) 23, 625 - 626 (1976) ; Biol. Abstr. 63, 66159 (1977)

40) KNAUS E.E., R.T. COUTIS und C.W. KAZAKOFF : The separation, identification, and quantitation of cannabinoids and their t-butyldimethylsilyl, trimethylsilylacetate, and diethyl-phosphate derivatives using high-pressure liquid chromatography, gas-liquid chromatography, and mass spectrometry. J. Chromatogr. 14, 525 - 530 (1976)

41) KULIKOVA G.S., V.E. KIRICHENKO und K.I. PASHKEVICH : Gas-liquid chromatographic determination of aniline derivatives in water. Zh.Anal. Khim. 34, 790 - 793 (1979) engl. transl. 34, 612 - 614 (1979)

42) KUßMAUL H. und M. HEGAZI : Zur Analytik von Phenylharnstoff-Herbiziden im Wasser. Gaschromatographische Bestimmung der Wirkstoffe und Metaboliten. Vom Wasser 44, 31 - 47 (1975)

43) LIBEER J.-C., S.L. SCHARPÉ, R.M. VERKERK, A.J. DEPRETTERE und P.J. SCHEPENS : Simultaneous determination of p-aminobenzoic acid, acetyl-p-aminobenzoic acid and p-aminohippuric acid in serum and urine by capillary gas chromatography with use of a nitrogen-phosphorus detector. Clin. Chim. Acta 115, 119 - 123 (1981)

44) MEDDLE D.W. und A.F. SMITH : Field method for the determination of aromatic amines in air . Part I. Generation of standard atmospheres of amines. Analyst 106, 1082 -1087 (1981) Part II. Development of a sensitive field test. Analyst 106, 1088 - 1095 (1981)

45) NARASIMHACHARI N. : Evaluation of C_{18} Sep-Pak catridges for biological sample clean-up for tricyclic antidepressant assays. J. Chromatogr. 225, 189 - 195 (1981)

46) NORWITZ G. und P.N. KELIHER : Spectrophotometric determination of aniline by the diazotization-coupling method with 8-amino-1-hydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid as the coupling agent. Anal. Chem. 53, 56 - 60 (1981)

47) NORWITZ G. und P.N. KELIHER : Spectrophotometric determination of aniline by the diazotization-coupling method with N-(1-naphthyl)-ethylenediamine as the coupling agent. Anal. Chem. 53, 1238 - 1240 (1981)

48) OLUFSEN B. : Glass capillary columns in the gas chromatographic separation of aromatic amines .
J. Chromatogr. 179, 97 - 103 (1979)

49) PARSONS J.S. : Gas chromatography of aminobenzene sulfonic acids by forming volatile sulfonyl and phosphoramidic chloride derivatives. J. Chromatogr. Sci. 11, 659 - 660 (1973)

50) SASSE K. : Organische Phosphorverbindungen, in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Bd. XII/1, Herausg. E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1963) S. 289

51) SCHULTZ T.W., L.M. KYTE und J.N. DUMONT : Structure-toxicity correlations of organic contaminants in aqueous coal-conversion effluents. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 7, 457 - 463 (1978)

52) SCHULTZ T.W. und T.C. ALLISON : Toxicity and toxic interaction of aniline and pyrodine. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23, 814 - 819 (1979)

53) SMITH J.S. und J.M. HANRAHAN : Adsorption-derivatization gas chromatographic-mass spectroscopic determination of aqueous 1,6-hexanediamine at the low and sub-ppm-level. J. Chromatogr. 193, 271 - 276 (1980)

54) VILCEANU R. und P. SCHULZ : Gaschromatographie einiger Derivate phosphorhaltiger Heterocyclen. Nachweis kleiner Alkoholmengen mit dem Phosphordetektor.
J. Chromatogr. 82, 279 - 284 (1973)

55) VOGT W. : Steroid-Phosphinsäureester: Eine neue Derivatklasse zur selektiven, gaschromatographischen Bestimmung von Monohydroxysteroiden. Habilitationsschrift, Universität München, Fachbereich Medizin, 1976

56) VOGT W., K. JACOB, I. FISCHER und M. KNEDEL : New gas-chromatographic method for quantitative determination of plasma 3-alpha-etiocholanolone with the alkali flame detector. Z. Anal. Chem. 279, 158 - 159 (1976)

LEBENSLAUF

20.12.1950	Geburt in Stuttgart
April 1957	Einschulung an der Schillerschule, Stuttgart-Bad Cannstatt
April 1961	Übertritt an das Elly Heuss-Knapp-Gymnasium, Stuttgart-Bad Cannstatt
Juni 1969	Abitur am gleichnamigen Gymnasium
Nov. 1969	Beginn des Studiums der Chemie an der Ludwig Maximilians-Universität München
31. 7.1975	Diplom-Hauptprüfung in Chemie an der Universität München
Sept. 1975 - Juni 1976	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Institutes München
Sept. 1976 - Juli 1980	Dissertation unter Leitung von PD Dr.rer.nat. H. Scheer am gleichnamigen Institut Während dieser Zeit wissentschaftliche Angestellte am Botanischen Institut, München
Feb. 1977	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität
August 1978	Physikum in Humanmedizin
März 1980	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1982	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12.10 1983	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Nov. 1980 - Nov. 1981	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. med. W. Vogt